

B17

Alkylidenedi xy compounds.

Patent number: EP0184990
Publication date: 1986-06-18
Inventor: ZIMMERMANN MARKUS DR; WEHRLI WALTER DR; SCHMIDTRUPPIN KARL HEINZ DR
Applicant: CIBA GEIGY AG (CH)
Classification:
- international: C07D493/04; A61K31/35
- european: C07D493/04
Application number: EP19850810556 19851121
Priority number(s): CH19840005630 19841126

Also published as

OA8175 (A)
MC1711 (A)
JP6113025
FI854633 (A)
DD239205
PT81555 (A)
GR852816
DK544585

less <<

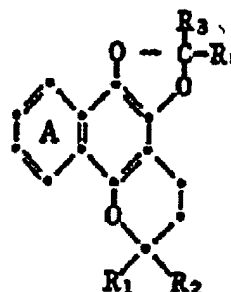
Cited documents:

GB104017

Abstract of EP0184990

Compounds of the formula

in which R1 and R2 independently of one another denote hydrogen, lower alkyl or aryl or, taken together, denote lower alkylene, R3 and R4 independently of one another denote hydrogen, lower alkyl or aryl or, taken together, denote lower alkylene, and the ring A has no additional substituents or is additionally substituted by lower alkyl, lower alkoxy and/or halogen, are active in retrovirus-induced Rauscher leukaemia of the mouse and can therefore be used therapeutically, for example in the control of immune diseases or autoimmune diseases likewise caused by retroviruses.



12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 85810556.2

51 Int. Cl.⁴: **C 07 D 493/04, A 61 K 31/35**

22 Anmeldetag: 21.11.85

30 Priorität: 26.11.84 CH 5630/84

71 Anmelder: **CIBA-GEIGY AG, Kybeckstrasse 141,
CH-4002 Basel (CH)**

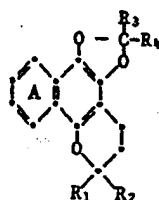
43 Veröffentlichungstag der Anmeldung: 18.06.86
Patentblatt 86/25

84 Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE FR GB IT LI LU
NL SE**

72 Erfinder: **Zimmermann, Markus, Dr., Steinbrecheweg 8,
CH-4125 Riehen (CH)**
 Erfinder: **Wehrli, Walter, Dr., Aescherstrasse 23,
CH-4054 Basel (CH)**
 Erfinder: **Schmidtruppin, Karl Heinz, Dr., Im
Baumgarten 5, CH-4144 Arlesheim (CH)**

54 Alkyldendioxy-Verbindungen.

57 Verbindungen der Formel



(I).

worin R₁ und R₂ unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederal kyl oder Aryl oder zusammenge nommen Niederal ky len bedeuten, R₃ und R₄ unabhängig voneinander Wasser stoff, Niederal kyl oder Aryl oder zusammenge nommen Niederal ky len bedeuten, und der Ring A keine zusätz liche Substituenten hat oder zusätz lich durch Niederal kyl, Nieder alkoxy und/oder Halogen substituier t ist, sind wirksam bei der durch einen Retrovirus induzierten Rauscher Leukämie der Maus und können daher therapeutisch beispiels weise bei der Bekämpfung von ebenfalls durch Retroviren verur sachten Immunkrankheiten oder Autoimmunkrankheiten verwendet werden.

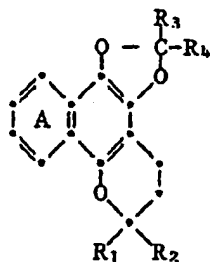
CIBA-GEIGY AG
Basel (Schweiz)

4-15168/+

Alkylidendioxy-Verbindungen

Die vorliegende Erfindung betrifft Alkylidendioxy-Verbindungen sowie deren Herstellung, ferner pharmazeutische Präparate enthaltend solche Verbindungen und die Verwendung von letzteren als pharmakologische Wirkstoffe.

In erster Linie betrifft die vorliegende Erfindung die Verbindungen der Formel



(I),

worin R_1 und R_2 unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl oder Aryl oder zusammengekommen Niederalkylen bedeuten, R_3 und R_4 unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl oder Aryl oder zusammengekommen Niederalkylen bedeuten, und der Ring A keine weiteren Substituenten hat oder zusätzlich durch Niederalkyl, Niederalkoxy und/oder Halogen substituiert ist.

Vorstehend, wie nachfolgend mit "nieder" bezeichnete monovalente organische Reste sowie Verbindungen enthalten n bis einschliesslich 7, vorzugsweise bis einschliesslich 4, und in erster Linie 1 oder 2 Kohlenstoffatome. Bivalente organische Reste enthalten vorzugsweise 4 bis 6 Kohlenstoffatome.

Niederalkyl bedeutet in erster Linie Methyl und Aethyl, kann aber auch für n-Propyl, Isopropyl, n-Butyl, Isobutyl oder tert-Butyl, ferner für n-Pentyl, n-Hexyl und n-Heptyl stehen.

Aryl ist in erster Linie monocyclisches, carbocyclisches Aryl, z.B. gegebenenfalls substituiertes Phenyl, wobei Substituenten u.a. Niederalkyl, Niederalkoxy oder Halogen sein können.

Niederalkylen ist z.B. 1,4-Butylen, 1,5-Pentylen oder 1,6-Hexylen.

Niederalkoxy ist insbesondere Methoxy oder Aethoxy, ferner n-Propoxy, Isopropoxy, n-Butoxy oder Isobutoxy, ferner n-Pentyloxy.

Halogen bedeutet vorzugsweise Halogen mit einer Atomnummer von höchstens 35, d.h. Fluor, Chlor oder Brom.

Es wird angenommen, dass die Verbindungen der vorliegenden Erfindung Prodrugs zur Hemmung der reversen Transkriptase sind, ein für Retroviren (oder Onconaviren), wie RNS-Tumor- und Leukämieviren, charakteristisches Enzym; Retroviren benötigen dieses Enzym für ihren natürlichen Replikationszyklus (Baltimore, Nature, Bd. 226, S. 1209 (1970); und Temin und Mizutani, Nature, Bd. 226, S. 1211 (1970)).

Die Wirkung auf Virusinfektionen kann anhand von in vivo-Testanordnungen festgestellt werden. So besitzen Verbindungen der Formel I in Tierexperimenten bei gewissen neoplastischen Krankheiten, die durch RNS-Tumorviren hervorgerufen werden, oder bei denen RNS-Tumorviren nachweisbar sind, eine starke Wirksamkeit. Sie verlängern z.B. die mittlere Überlebensdauer von Mäusen nach Infektion mit Rauscher-Leukämie-Virus (RLV, ein RNS-Tumorvirus).

Bei den Versuchen mit Rauscher-Leukämie 4 Q (NIH) werden weibliche Balb/c-Mäuse (28 bis 34 Tage alt) mit 0,2 ml einer zehnfach mit Hanks Lösung verdünnten Virussuspension aus Milzmaterial von 4-6 Wochen vorher infizierten Mäusen infiziert. In einem Versuch werden je 15 Tiere entweder mit der Testverbindung oder als Kontrollen mit Placebo kontinuierlich per os behandelt. Die erste Verabreichung erfolgt 30 Minuten vor der Infektion, weitere Verabreichungen täglich einmal und fünfmal in der Woche während 4 Wochen. Als Kriterium für die Wirkung dient die Verlängerung der Überlebenszeit. Während bei den Kontrolltieren ab 30 Tagen nach der Infektion eine Leukämie mit leukämischen Blutzellen von über 50000/mm³ gefunden werden können und die Tiere zu sterben beginnen, wird die Überlebenszeit der mit 125 mg/kg p.o. der Testsubstanz behandelten weiblichen Mäuse signifikant verlängert. Sie beträgt z.B. für das 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-6H-(1,3-dioxolo)[3,4]-naphtho[1,2-b]pyran bei 20-maliger p.o.-Verabreichung an weiblichen Balb/c-Mäusen von je 125 mg/kg (10 Tiere pro Gruppe) 60,9 Tage, verglichen mit Überlebenszeit der Kontrolltiere von 31,7 Tagen ($p \leq 0,001$ Cox-Test).

Die pharmakologische Wirksamkeit der Verbindungen der vorliegenden Erfindung ist begleitet von einer guten Verträglichkeit. So liegt die maximal tolerierte Dosis für das obengenannte 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-6H-(1,3-dioxolo)[3,4]naphtho[1,2-b]pyran in Mäusen nach einmaliger p.o- und i.p.-Verabreichung und anschliessender 7-tägiger Beobachtungsdauer über 2500 mg/kg bzw. über 1250 mg/kg.

Der Nachweis von Erkrankungen, die durch Retroviren verursacht werden, basiert z.B. auf den folgenden Befunden: Der Nachweis von Typ C-Retroviren und deren Bildung von reverser Transkriptase beim Menschen erfolgte zuerst bei einer T-Zellen Leukämie; das Virus wurde Human T-cell leukaemia virus (HTLV-I) genannt. Bei weiteren T-Zellen-Leukämien und -Lymphomen wurden die gleichen Viren und ein ähnliches Retrovirus (HTLV-II) gefunden (Gallo, Cancer Surveys (Ed. Franks, Wyke und Weiss), Bd. 3, S. 113-160 (Oxford Univ.

Press, 1984)). Schliesslich wurde ein derartiges Virus auch im Zusammenhang mit AIDS (Acquir d Immune Deficiency Syndrome)-Erkrankungen isoliert (Gottlieb et al., Morbid. Mortal. Weekly Rep., Bd. 30, S. 25,(1981); Friedman-Kien et al., Morbid. Mortal. Weekly Rep., Bd. 30, S. 305 (1981); Gottlieb et al., New Engl. J. Med., Bd. 305, S. 1425 (1981); Masur, New Engl. J. Med., Bd. 305, S. 1431 (1981); Siegal et al., New Engl. J. Med., Bd. 305, S. 1439 (1981); CDC Task Force on Kaposi's Sarcoma and Opportunistic Infections, New Engl. J. Med., Bd. 306, S. 248 (1982)); dieses wurde mit HTLV-III bezeichnet (Essex et al., Science, Bd. 220, S. 859 (1983), Gelmann et al., Bd. 220, S. 862 (1983); Gallo et al., Science, Bd. 220, S. 865 (1983); Gallo, Cancer Surverys, Bd. 3 S. 113 (1984); Barré-Sinoussi et al., Science Bd. 220, 868 (1983); Hirsch und Levy, Viruses in Human Malignancy and AIDS, ASCO/AACR Symposium, May 1984, Toronto).

Diese, der HTLV-Familie angehörenden Retroviren benötigen die reverse Transkriptase für die Bildung einer Doppelstrang-DNA (Provirus), welche in das Zell-Genom "integriert" wird und zur malignen Transformation führen kann (Strayer und Gillespie, The Nature and Organization of Retroviral Genes in Animal Cells. Virology Monographs, Bd. 17 (Springer Ed., 1980)).

Während nach der Induktion maligner leukämischer, lymphatischer oder tumoröser Neubildungen durch Retroviren eine Abnahme der reversen Transkriptase und der Viren HTLV-I und -II nachgewiesen werden kann und sekundäre, durch diese Viren induzierte Oncogene die Replikation der malignen Zellen steuern, ist das Virus HTLV-III und die reverse Transkriptase bei AIDS nicht nur im Frühstadium, sondern während des ganzen Krankheitsverlaufs nachweisbar. Die laufende Infektion und Funktionsstörung von immunkompetenten T-Helfer Zellen führt schliesslich zum Zusammenbruch des Immunsystems mit letalem Ausgang. Es ist anzunehmen, dass eine Hemmung der reversen Transkriptase und der Virusreplikation bei positivem Enzym- und Virusantigen-Nachweis (Beardsley, Nature, Bd. 311, S. 195 (1984)) in Risikopatienten, z.B.

Homosexuellen, den Krankheitsprozess beeinflusst. Bei der Induktion von Leukämien und Lymphomen durch Retroviren (HTLV-I und HTLV-II), wie möglicherweise auch bei durch Retroviren induzierten Sarkomen oder Mammakarzinomen, sollte dagegen eine prophylaktische Anwendung möglich sein, sofern eine leicht und breit verfügbare diagnostische Erfassung von derartigen Risikopatienten vorausgesetzt werden kann.

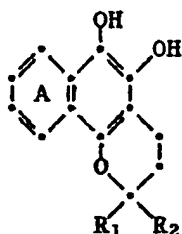
Auch im Zusammenhang mit der nicht-A- und nicht-B-Hepatitis ist die reverse Transkriptase als spezifisches Enzym in Assoziation mit Viruspartikeln gefunden worden (Seto et al., Lancet, S. 941 (1984)).

Die Verbindungen der vorliegenden Anmeldung können deshalb zur Prophylaxe und Therapie von Krankheiten, bei denen die reverse Transkriptase von Bedeutung ist, vor allem von durch Typ-C-Retroviren verursachten oder mitverursachten malignen Erkrankungen, aber auch von gewissen Immunkrankheiten und Autoimmunkrankheiten Verwendung finden. Als Tumorkrankheiten kommen in erster Linie durch Retroviren verursachte Leukämien, Lymphome und Lymphosarkome, sowie Osteosarkome und Mammakarzinome in Betracht. Die Verbindungen der Erfindung eignen sich besonders auch zur Rezidivprophylaxe nach chirurgischer Therapie, Strahlentherapie oder zytostatischer oder antimetabolischer Chemotherapie. Als Immunkrankheit sei AIDS, als Autoimmunkrankheit systemischer Lupus erythematosus genannt, bei denen nach neueren Befunden RNS-Tumoviren auch eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Dennman, Med., Biol., Bd. 53, S 61 (1975); Panem et al., New England J. Med., Bd. 295, 470 (1976)).

Die Erfindung betrifft insbesondere Verbindungen der Formel I, worin R_1 Wasserstoff oder Niederalkyl und R_2 Wasserstoff, Niederalkyl oder Phenyl bedeuten, R_3 und R_4 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Niederalkyl bedeuten, und der Ring A keine weiteren Substituenten hat oder zusätzlich durch Niederalkyl, Niederalkoxy und/oder Halogen substituiert ist, wobei mit "nieder" bezeichnete Reste vorzugsweise 1 oder 2 Kohlenstoffatome enthalten, und Halogen eine Atomnummer von höchstens 35 hat.

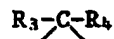
Die Erfindung betrifft in erster Linie Verbindungen der Formel I, worin R_1 Wasserstoff oder Niederalkyl und R_2 Niederalkyl oder Phenyl bedeuten, und beide Reste R_3 und R_4 Wasserstoff oder unabhängig voneinander Wasserstoff oder Niederalkyl bedeuten, wobei mit "nieder" bezeichnete Reste vorzugsweise 1 oder 2 Kohlenstoffatome enthalten.

Die Verbindungen der Formel I können in an sich bekannter Weise hergestellt werden, z.B. indem man eine Verbindung der Formel



(II),

oder ein reaktionsfähiges Derivat davon mit einem den Rest der Formel

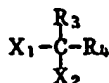


(Ia)

einführenden Reagens umsetzt.

Reaktionsfähige Derivate von Verbindungen der Formel II sind z.B. Salze, wie Alkalimetall-, z.B. Natrium- oder Kaliumsalze.

Reagenzien, die sich zur Einführung des Restes der Formel Ia eignen, sind z.B. Verbindungen der Formel



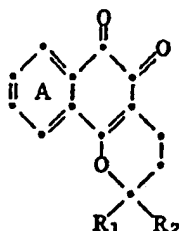
(III),

worin X_1 und X_2 unabhängig voneinander für veräthertes oder verestertes Hydroxy, in erster Linie jedoch zusammengekommen für die Diazogruppe stehen. Veräthertes Hydroxy ist z.B. Niederalkoxy, wie Methoxy oder Aethoxy, während verestertes Hydroxy insbesondere für Halogen, insbesondere Brom oder Jod, oder für Niederalkan yloxy,

z.B. Acetoxy, steht. Bevorzugte Verbindungen der Formel III sind die entsprechenden Diazoverbindungen, insbesondere Diazoniederalkane, und in erster Linie Diazomethan.

Die Reaktion wird in an sich bekannter Weise durchgeführt, üblicherweise in Gegenwart eines geeigneten Verdünnungs- oder Lösungsmittels, das Diazoreagens vorzugsweise in Gegenwart eines wasserfreien ätherischen Lösungsmittels, wie Diäthyläther und/oder Tetrahydrofuran, wenn notwendig unter Kühlen oder Erwärmen, z.B. in einem Temperaturbereich von etwa -10°C bis etwa 100°C , in einem geschlossenen Gefäß und/oder in einer Inertgasatmosphäre.

Die Ausgangsstoffe der Formel II können z.B. durch Reduktion der entsprechenden bekannten Chinonverbindungen der Formel



(IV),

wie durch katalytische Hydrierung, erhalten werden. Vorzugsweise werden die Ausgangsstoffe (II) in situ hergestellt, da sie sehr leicht in die entsprechenden Chinone der Formel IV zurückoxidiert werden. Da Diazoverbindungen der Formel III die Chinonverbindungen (IV) in die Ausgangsstoffe der Formel Ia reduzieren und gleichzeitig den gewünschten Rest der Formel IIa einführen können, stellt die Verfahrensvariante, lt. welcher eine Verbindung der Formel IV mit einer Verbindung der Formel III, worin X_1 und X_2 zusammen für die Diazogruppe stehen, insbesondere mit einem Diazoniederalkan und in erster Linie mit Diazomethan umgesetzt wird, wobei man mit einem Ueberschuss der Diazoverbindung (III) arbeitet, das bevorzugte Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I dar.

Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Präparate, die als Wirkstoffe eine der erfindungsgemässen Verbindungen der Formel I enthalten. Bei den erfindungsgemässen pharmazeutischen Präparaten handelt es sich um solche zur enteralen, wie oralen oder rektalen oder parenteralen Verabreichung, z.B. i.v., i.m. oder topisch. Die Präparate enthalten entweder ausschliesslich den Wirkstoff oder vorzugsweise den Wirkstoff vermisch mit einem pharmazeutisch anwendbaren Trägermaterial. Die Dosierung des Wirkstoffs hängt von der zu behandelnden Spezies, ihrem Alter und individuellen Zustand, sowie von der Applikationsweise ab.

Die pharmazeutischen Präparate enthalten von etwa 5 % bis etwa 95 % des Wirkstoffs, wobei einzeldosierte Präparate vorzugsweise von etwa 20 % bis etwa 90 % und nicht-einzeldosierte Präparate vorzugsweise etwa 5 % bis etwa 20 % Wirkstoff aufweisen. Erfindungsgemässe pharmazeutische Präparate in Dosiseinheitsform, wie Dragées, Tabletten, Kapseln, Suppositorien oder Ampullen, enthalten etwa 0,05 g bis etwa 1,5 g, vorzugsweise etwa 0,1 g bis etwa 1,0 g des Wirkstoffs.

Die pharmazeutischen Präparate der vorliegenden Erfindung werden in an sich bekannter Weise, z.B. mittels konventioneller Misch-, Granulier-, Dragier-, Lösungs- oder Lyophilisierungsverfahren hergestellt. So kann man pharmazeutische Präparate zur oralen Anwendung erhalten, indem man den Wirkstoff mit einem oder mehreren festen Trägerstoffen kombiniert, ein erhaltenes Gemisch gegebenenfalls granuliert, und das Gemisch bzw. Granulat, wenn erwünscht, gegebenenfalls nach Zugabe von zusätzlichen Hilfsstoffen, zu Tabletten oder Dragées-Kernen verarbeitet.

Geeignete Trägerstoffe sind insbesondere bezüglich pharmakologischer Wirkung inerte Füllstoffe, wie Zucker, z.B. Lactose, Saccharose, Mannit oder Sorbit, Cellulosepräparate und/oder Calciumphosphate, z.B. Tricalciumphosphat oder Calciumhydrogenphosphat, ferner Bindemittel, wie Stärken, z.B. Mais-, Weizen-, Reis- oder Kartoffelstärke, Methylcellulose, Hydroxypropylmethylcellulose,

Natriumcarboxymethylcellulose und/oder Polyvinylpyrrolidon, und/oder, wenn erwünscht, Sprengmittel, wie die oben genannten Stärken, ferner Carboxymethylstärke, quervernetztes Polyvinylpyrrolidon, Alginsäure oder ein Salz davon, wie Natriumalginat. Zusätzliche Hilfsmittel sind in erster Linie Flie遳regulier- und Schmiermittel, z.B. Kieselsäure, Talk, Stearinsäure oder Salze davon, wie Magnesium- oder Calciumstearat, und/oder Polyäthylenglycol.

Dragées-Kerne werden mit geeigneten, gegebenenfalls Magensaft-resistenten, Ueberzügen versehen, wobei man u.a. konzentrierte Zuckerlösungen, welche gegebenenfalls arabischen Gummi, Talk, Polyvinylpyrrolidon, Polyäthylenglycol und/oder Titandioxid enthalten, Lacklösungen in geeigneten organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen oder, zur Herstellung von Magensaft-resistenten Ueberzügen, Lösungen von geeigneten Cellulosepräparaten, wie Acetylcellulosephthalat oder Hydroxypropylmethylcellulosephthalat, verwendet. Den Tabletten oder Dragées-Ueberzügen können Farbstoffe oder Pigmente, z.B. zur Identifizierung oder zur Kennzeichnung verschiedener Wirkstoffdosen, beigelegt werden.

Weitere, oral anwendbare pharmazeutische Präparate sind Steckkapseln aus Gelatine sowie weiche, geschlossene Kapseln aus Gelatine und einem Weichmacher, wie Glycerin oder Sorbitol. Die Steckkapseln können den Wirkstoff in Form eines Granulats, z.B. im Gemisch mit Füllstoffen, wie Maisstärke, Bindemitteln und/oder Gleitmitteln, wie Talk oder Magnesiumstearat, und gegebenenfalls von Stabilisatoren, enthalten. In weichen Kapseln ist der Wirkstoff vorzugsweise in geeigneten Flüssigkeiten, wie fetten Ölen, Paraffinöl oder flüssigem Polyäthylenglycol, gelöst oder suspendiert, wobei ebenfalls Stabilisatoren zugelegt sein können.

Weitere orale Applikationsformen sind z.B. in üblicher Weise bereitete Sirups, die den Wirkstoff z.B. in suspendierter Form und in einer Konzentration von ca. 5 % bis 20 %, vorzugsweise ca. 10 % oder in einer ähnlichen Konzentration, die z.B. beim Abmessen von 5 der 10 ml eine geeignete Einzeldosis ergibt, enthalten. Ferner

kommen z.B. auch pulverförmige oder flüssige Konzentrate zur Bereitung von Shakes, z.B. in Milch, in Betracht. Solche Konzentrate können auch in Einzeldosismengen abgepackt sein.

Als rektal anwendbare pharmazeutische Präparate kommen z.B. Suppositorien in Betracht, welche aus einer Kombination des Wirkstoffs mit einer Suppositoriengrundmasse bestehen. Als Suppositoriengrundmasse eignen sich z.B. natürliche oder synthetische Triglyceride, Paraffine, Polyäthylenglykole oder höhere Alkanole. Ferner können auch Gelatine-Rektalkapseln verwendet werden, die aus einer Kombination des Wirkstoffes mit einer Grundmasse bestehen; als Grundmassenstoffe kommen z.B. flüssige Triglyceride, Polyäthylenglykole oder Paraffine in Frage.

Zur parenteralen Verabreichung kommen z.B. Suspensionen von Verbindungen der vorliegenden Erfindung wie entsprechende ölige Injektionssuspensionen, in Betracht, wobei man geeignete lipophile Lösungsmittel oder Vehikel, wie fette Öle, z.B. Sesamöl, oder synthetische Fettsäureester, z.B. Äthylöleat oder Triglyceride, verwendet, oder es eignen sich wässrige Injektionssuspensionen, welche viskositätserhöhende Stoffe, z.B. Natriumcarboxymethylcellulose, Sorbit und/oder Dextran, und gegebenenfalls auch Stabilisatoren enthalten.

Zur parenteralen Verabreichung eignen sich insbesondere Liposomendispersionen mit Verbindungen der Formel I. Die Liposomendispersionen werden aus mindestens zwei Lipidkomponenten, z.B. Phosphatidylserin und Phosphatidyläthanolamin oder Phosphatidylserin und Phosphatidylcholin, gebildet, welche Verbindungen (I) verkapseln.

Zur Herstellung der Liposomendispersion eignet sich für die eine Lipidkomponente Phosphatidylserin natürlicher Herkunft mit verschiedenen oder identischen C_{10} - C_{20} -Alkanoylresten, z.B. n-Dodecanoyl, n-Tetradecanoyl, n-Hexadecanoyl oder n-Octadecanoyl, oder C_{10} - C_{20} -Alkenylresten, z.B. 9-cis-Dodecenoyl, 9-cis-Tetradecenoyl, 9-cis-Hexadecenoyl, 6-cis-, 6-trans-, 9-cis-, 9-trans- oder 11-cis-

Octadecenoyl oder 9-cis-Icos noyl, z.B. Phosphatidylserin aus dem Rinderhirn, oder synthetisch s Phosphatidylserin mit identischen C_{10} - C_{20} -Alkenoylresten, z.B. Natrium-1,2-di-(9-cis-octadecenoyl)-3-sn-phosphatidyl-(S)-serin, und für die andere Lipidkomponente Phosphatidylcholin natürlicher Herkunft mit verschiedenen oder identischen C_{10} - C_{20} -Alkanoylresten, z.B. Phosphatidylcholin aus dem Hühnerei oder aus Sojaöl, synthetisches Phosphatidylcholin mit identischen C_{10} - C_{20} -Alkanoylresten, z.B. Dimyristoyl-, Distearoyl- oder Dipalmitoylphosphatidylcholin, oder synthetisches Phosphatidylcholin mit einem C_{10} - C_{20} -Alkanoyl- und einem C_{10} - C_{20} -Alkenoylrest, z.B. 1-n-Hexadecanoyl-2-(9-cis-octadecenoyl)-3-sn-phosphatidylcholin.

Die Liposomendispersion lässt sich herstellen, indem man beispielsweise ein Lyophilisat aus den Lipidkomponenten und der Verbindung (I) gemäss dem in der Deutschen Offenlegungsschrift 2818655 beschriebenen Verfahren herstellt, vorzugsweise nach Lösen der Lipidkomponenten und des Wirkstoffs in tert-Butanol, und Abziehen des Lösungsmittels bei Temperaturen unterhalb -20° , und dieses Lyophilisat in einer isotonischen Pufferlösung dispergiert. Die Dispersion erfolgt durch Schütteln (Vortex-Mischer) oder Rühren der wässrigen Phase. Die Liposomendispersion kann anschliessend durch Zentrifugation angereichert und/oder durch Gelfiltration oder Extrusion durch geradporige Filter abgetrennt werden.

Dieses Verfahren eignet sich, wenn lipophile bzw. in organischen Lösungsmitteln, z.B. tert-Butanol, lösliche Verbindungen (I) verwendet werden. Bei wasserlöslichen Verbindungen (I) stellt man ein Lyophilisat nur aus den Lipidkomponenten her und dispergiert dieses in wässriger Phase, welche die gelöste Verbindung (I) enthält.

Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Behandlung von Krankheiten, bei denen, wie oben beschrieben worden ist, die reverse Transkriptase von Bedeutung ist, dadurch gekennzeichnet, dass man eine prophylaktisch oder therapeutisch wirksame Menge einer erfin-

dungsgemässen Verbindung der Formel I verabreicht. Dabei verwendet man in erster Linie die obengenannten pharmazeutischen Präparat , wobei man einem Warmblüter von etwa 70 kg Gewicht eine tägliche Dosis von etwa 0,1 g bis etwa 5 g, vorzugsweise von etwa 0,5 g bis etwa 1,5 g, einer Verbindung der vorliegenden Erfindung verabreicht.

Die nachfolgenden Beispiele illustrieren die vorliegende Erfindung; Temperaturen werden in Celsiusgraden angegeben.

Beispiel 1: 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-6H-(1,3-dioxolo)[3,4]-naphtho[1,2-b]pyran

Eine Lösung von Diazomethan in Diäthyläther (hergestellt aus 40 g Nitrosomethylharnstoff und 400 ml Diäthyläther) wird tropfenweise bei einer Temperatur von 2-3° mit einer Lösung von 22,4 g 2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dion (β -Lapachon) in 200 ml Tetrahydrofuran versetzt. Das Reaktionsgemisch wird während 16 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Lösungsmittelgemisch wird unter vermindertem Druck abgedampft, der Rückstand in 400 ml Methylenchlorid gelöst und rasch durch 400 g Silicagel (Merck; 0.063 - 0,2 mm) filtriert. Aus den ersten Filterfraktionen wird beigefarbenes, kristallines Material erhalten (Dünnschichtchromatogramm auf Silicagel 60 F₂₅₄ Merck; Rf 0,73 (Chloroform)), das, aus Isopropanol umkristallisiert die Titelverbindung ergibt, Smp. 84-85°.

Beispiel 2: 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-6H-(1,3-dioxolo)[3,4]-naphtho[1,2-b]pyran

Eine Lösung von 12,1 g 2,2-Dimethyl-3,4-dihydro-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dion (β -Lapachon) in 120 ml Dimethylformamid wird mit 11 g Triäthylamin und 1 g eines Platin-auf-Kohle-Katalysators (5 %) versetzt und bei Raumtemperatur und unter normalem Druck hydriert. Unter Ausschluss von Sauerstoff werden 10,5 ml Methyleniodid zugegeben und das Gemisch während 5 Stunden bei 100° erwärmt. Man kühlt ab, filtriert und engt das Filtrat unter vermindertem Druck auf ein Volumen von etwa 40 ml ein. Man verdünnt mit 200 ml

Wasser; der entstandene Niederschlag wird abfiltriert und mit Diäthyläther versetzt. Die überstehende Lösung wird abdekantiert, mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und unter vermindertem Druck eingedampft. Der Rückstand wird in Methylenchlorid aufgenommen und an 200 g Silicagel unter Verwendung von Methylenchlorid chromatographiert. Die gewünschte Titelverbindung wird aus den ersten Fraktionen erhalten; es ist lt. Dünnschichtchromatogramm mit der Titelverbindung des Beispiels 1 identisch.

Beispiel 3: 9-Chlor-6,6-dimethyl-4,5-dihydro-6H-(1,3-dioxolo)-[3,4]naphtho[1,2-b]pyran

Eine auf +5° gekühlte Lösung von 500 mg 9-Chlor-2,2-dimethyl-3,4-dihydro-2H-naphtho[1,2-b]pyran-5,6-dion (9-Chlor- β -Lapachon), Herstellung gemäss J.Med.Chem. 1984, 27, 990-994, in 5 ml THF wird mit 20 ml einer Lösung von Diazomethan in Äther versetzt und während 16 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Lösungsmittelgemisch wird bei reduziertem Druck entfernt und der Rückstand aus 4 ml Isopropanol kristallisiert. Es werden gelb-beige Kristalle der Titelverbindung vom Schmelzpunkt 116-118° erhalten. Aus der Mutterlauge wird durch Chromatographieren an 50 g Silicagel und Elution mit Essigester-Cyclohexan (1:3) weitere Titelverbindung erhalten.

Beispiel 4: 6-Methyl-6-phenyl-4,5-dihydro-6H-(1,3-dioxolo)[3,4]-naphtho[1,2-b]pyran

Eine auf +5° gekühlte Lösung von 500 mg 2-Methyl-2-phenyl-3,4-dihydro-2H-naphtho[1,2-b]pyran (2-Desmethyl-2-phenyl- β -Lapachon), Herstellung gemäss J.Med.Chem. 1984, 27, 994 in 5 ml THF wird mit 20 ml einer Lösung von Diazomethan in Äther versetzt und während 16 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Lösungsmittelgemisch wird bei reduziertem Druck entfernt und der Rückstand an 50 g Silicagel und durch Elution mit Äthylenchlorid-Methanol (98:2) chromatographiert. Aus Isopropanol wird gelb-beige Titelverbindung erhalten.

Beispiel 5: Tabletten, enthaltend 500 mg 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-2H-(1,3-dioxolo)[3,4]naphtho[1,2-b]pyran, können wie folgt hergestellt werden:

Zusammensetzung (für 10000 Tabletten):

6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-2H-(1,3-dioxolo)-[3,4]naphtho[1,2-b]pyran	5000,00 g
Weizenstärke	790,00 g
Stearinsäure	30,00 g
Magnesiumstearat	30,00 g
Talk	400,00 g

Der Wirkstoff wird mit verkleisterter Weizenstärke, die durch Anrühren von 500 g Weizenstärke mit etwa 1300 ml entmineralisiertem Wasser erhalten wird, und mit weiteren 600 ml entmineralisiertem Wasser gleichmässig befeuchtet, zu einer schwach plastischen Masse geknetet und durch ein Sieb mit einer Maschenweite von etwa 3 mm getrieben. Das Granulat wird anschliessend getrocknet und erneut durch ein Sieb geschlagen. Dem trockenen und auf eine einheitliche Korngrösse gebrachten Granulat werden das Magnesiumstearat, die Stearinsäure, der Talk und der Rest der Weizenstärke zugemischt und das erhaltene Gemisch wird zu Tabletten verpresst.

Beispiel 6: Eine 10 %ige Suspension enthaltend 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-2H-(1,3-dioxolo)[3,4]naphtho[1,2-b]pyran, kann wie folgt hergestellt werden:

Zusammensetzung (für 5000 ml):

6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-2H-(1,3-dioxolo)-[3,4]naphtho[1,2-b]pyran	500,00 g
Propylenglycol	500,00 g
Hydroxypropylmethylcellulose	25,00 g
Zitronensäure	5,00 g
Saccharin-natrium	2,50 g
4-Hydroxy-benzoesäuremethylester	6,00 g

4-Hydroxy-benzoesäurepropyl ster	1,50 g
Himbeeraroma	5,00 g
70 %ige wässrige Sorbitlösung	1250 ml
entmineralisiertes Wasser	q.s.

Eine Suspension des Wirkstoffs in 250 g Propylenglycol und 1250 ml entmineralisiertem Wasser wird mit einer Kolloidmühle gemahlen. Die feine Suspension, mit einer durchschnittlichen Teilchengrösse von unter 10 μ m, wird in einer Lösung der Hydroxypropylmethylcellulose, der Zitronensäure und des Saccharin-natriums in 1250 ml entmineralisiertem Wasser und in der Sorbit-Lösung dispergiert. Unter Rühren werden zu dieser Suspension eine Lösung des 4-Hydroxy-benzoesäuremethylesters und des 4-Hydroxybenzoesäurepropylesters in 250 g Propylenglycol und das Himbeeraroma gegeben. Nach dem Ergänzen mit entmineralisiertem Wasser auf das Volumen von 5000 ml, erhält man eine Suspension, die 500 mg des Wirkstoffs in 5 ml enthält.

Beispiel 7: Kapseln, enthaltend je 300 mg 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-2H-(1,3-dioxolo)[3,4]naphtho[1,2-b]pyran, können wie folgt hergestellt werden:

Zusammensetzung (für 10000 Kapseln)

6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-2H-(1,3-dioxolo)-[3,4]naphtho[1,2-b]pyran	3000,00 g
Magnesiumstearat	100,00 g

Der Wirkstoff wird mit dem Magnesiumstearat vermischt und je 0,31 g des Gemisches mit Hilfe einer Verkapselungsmaschine in Hartgelatine-kapseln abgefüllt.

Beispiel 8: Eine wässrige Injektionssuspension (für intramuskuläre Verabreichung), enthaltend 1,0 g 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-2H-(1,3-dioxolo)[3,4]naphtho[1,2-b]pyran, pro 5 ml, kann wie folgt hergestellt werden:

Suspensionsmedium:

Natriumsalz v n. Carboxymethylcellulose	0,10 %
Gemisch von Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat	0,15 %
Natriumchlorid	0,75 %
Natriumsalz der S-Aethylmercuri- thiosalicylsäure (Thiomersal)	0,02 %
1,2 Propylenglycol	20,00 %
Destilliertes Wasser	ad 100,00 %

Der sterile Wirkstoff wird unter antimikrobiellen Bedingungen mit dem Suspensionsmedium so verarbeitet, dass eine sterile Suspension erhalten wird, die 1,0 g des Wirkstoffs in 5 ml enthält.

Beispiel 9: Eine wässrige Injektionssuspension (für intramuskuläre Verabreichung), enthaltend 0,75 g 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-2H-(1,3-dioxolo)[3,4]naphtho[1,2-b]pyran pro 5 ml, kann wie folgt hergestellt werden:

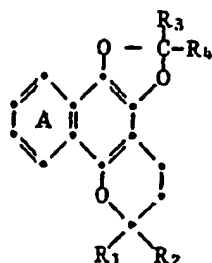
Suspensionsmedium:

Natriumchlorid	0,90 %
Natriumsalz der S-Aethylmercuri- thiosalicylsäure (Thiomersal)	0,02 %
Polyoxyäthylen(20)Sorbitan Monostearat (Molekulargewicht: 1311,7 g; Tween 60®)	0,75 %
Natriumsalz von Carboxymethylcellulose	0,50 %

Der sterile Wirkstoff wird unter antimikrobiellen Bedingungen mit dem Suspensionsmedium so verarbeitet, dass man eine sterile Suspension erhält, die 0,75 g Wirkstoff in 5 ml enthält.

Pat ntansprüche (für alle benannten Vertragsstaaten ausser
Oesterreich)

1. Verbindungen der Formel



(I),

worin R₁ und R₂ unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Aryl oder zusammengekommen Niederalkylen bedeuten, R₃ und R₄ unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Aryl oder zusammengekommen Niederalkylen bedeuten, und der Ring A keine zusätzliche Substituenten hat oder zusätzlich durch Niederalkyl, Niederalkoxy und/oder Halogen substituiert ist.

2. Verbindungen der Formel I gemäss Anspruch 1, worin R₁ Wasserstoff oder Niederalkyl und R₂ Wasserstoff, Niederalkyl oder Phenyl bedeuten, R₃ und R₄ unabhängig voneinander Wasserstoff oder Niederalkyl bedeuten, und der Ring A keine zusätzlichen Substituenten hat oder zusätzlich durch Niederalkyl, Niederalkoxy und/oder Halogen substituiert ist, wobei mit "nieder" bezeichnete Reste vorzugsweise 1 oder 2 Kohlenstoffatome enthalten, und Halogen eine Atomnummer von höchstens 35 hat.

3. Verbindungen der Formel I gemäss Anspruch 1, worin R₁ Wasserstoff oder Niederalkyl, R₂ Niederalkyl oder Phenyl und beide Reste R₃ und R₄ Wasserstoff oder unabhängig voneinander Wasserstoff oder Niederalkyl bedeuten, wobei mit "nieder" bezeichnete Reste vorzugsweise 1 oder 2 Kohlenstoffatome enthalten.

4. 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-6H-(1,3-diox 1o)[3,4]naphtho[1,2-b]-pyran, gemäss Anspruch 1.

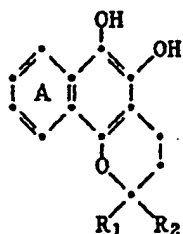
5. Pharmazeutische Präparate enthaltend als Wirkstoff eine Verbindung der Formel I gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4.

6. Verbindungen der Formel I zur Anwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

7. Die Verbindungen der Formel I gemäss einem der Ansprüche 1 bis 4 als Hemmer der reversen Transkriptase.

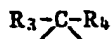
8. Verwendung der Verbindungen der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten.

9. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen des Anspruchs 1, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel



(II),

oder ein reaktionsfähiges Derivat davon mit einem, den Rest der Formel



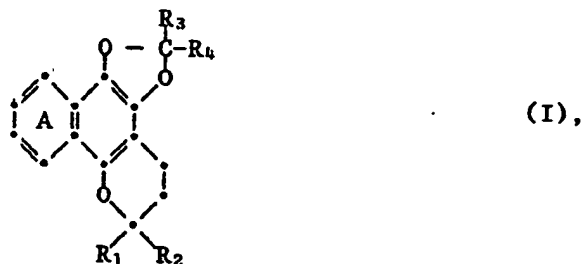
(Ia)

einführenden Reagens umgesetzt.

10. Die nach dem Verfahren des Anspruchs 9 erhältlichen Verbindungen.

Ansprüche (für den Vertragsstaat Oesterreich)

1. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel



worin R_1 und R_2 unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Aryl oder zusammengekommen Niederalkylen bedeuten, R_3 und R_4 unabhängig voneinander Wasserstoff, Niederalkyl, Aryl oder zusammengekommen Niederalkylen bedeuten, und der Ring A keine zusätzliche Substituenten hat oder zusätzlich durch Niederalkyl, Niederalkoxy und/oder Halogen substituiert ist, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Verbindung der Formel



oder ein reaktionsfähiges Derivat davon mit einem, den Rest der Formel



einführenden Reagens umgesetzt.

2. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I gemäss Anspruch 1, worin R_1 Wasserstoff oder Niederalkyl und R_2 Wasserstoff, Niederalkyl oder Phenyl bedeuten, R_3 und R_4 unabhängig voneinander Wasserstoff oder Niederalkyl bedeuten, und der Ring A

keine zusätzlichen Substituenten hat der zusätzlich durch Niederalkyl, Nied ralkoxy und/oder Halogen substitui rt ist, w bei mit "nieder" bezeichnete Reste vorzugsweise 1 oder 2 Kohlenstoffatome enthalten, und Halogen eine Atomnummer von höchstens 35 hat, dadurch gekennzeichnet, dass man ein entsprechend substituiertes Ausgangsmaterial der Formel II mit dem entsprechenden, den Rest der Formel Ia einführenden Reagens umsetzt.

3. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I gemäss Anspruch 1, worin R₁ Wasserstoff oder Niederalkyl, R₂ Niederalkyl oder Phenyl und beide Reste R₃ und R₄ Wasserstoff oder unabhängig voneinander Wasserstoff oder Niederalkyl bedeuten, wobei mit "nieder" bezeichnete Reste vorzugsweise 1 oder 2 Kohlenstoffatome enthalten, dadurch gekennzeichnet, dass man ein entsprechend substituiertes Ausgangsmaterial der Formel II mit dem entsprechenden, den Rest der Formel Ia einführenden Reagens umsetzt.

4. Verfahren zur Herstellung von 6,6-Dimethyl-4,5-dihydro-6H-(1,3-dioxolo)[3,4]naphtho[1,2-b]pyran, gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man β -Lapachon mit Diazomethan umsetzt.

FO 7.4 RS/sm*



Eur päisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

0184990

Nummer der Anmeldung

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			EP 85810556.2
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
A	GB - A - 1 040 176 (MERCK & CO) -----		C 07 D 493/04 A 61 K 31/35
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
			C 07 D 493/00
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
WIEN		03-03-1986	
		Prüfer	
		BRUS	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN			
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet			
Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie			
A : technologischer Hintergrund			
O : mchtschriftliche Offenbarung			
P : Zwischenliteratur			
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze			
E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist			
D : in der Anmeldung angeführtes Dokument			
L : aus andern Gründen angeführtes Dokument			
& : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 31/35	A1	(11) International Publication Number: WO 97/07797 (43) International Publication Date: 6 March 1997 (06.03.97)
(21) International Application Number: PCT/US96/13335 (22) International Filing Date: 19 August 1996 (19.08.96) (30) Priority Data: 60/002,829 25 August 1995 (25.08.95) US (71) Applicant (for all designated States except US): DANA-FARBER CANCER INSTITUTE [US/US]; 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): PARDEE, Arthur [US/US]; 30 Codman Road, Brookline, MA 02146 (US). LI, Chiang, J. [CN/US]; 61 Gardner Street, West Roxbury, MA 02132 (US). (74) Agents: EISENSTEIN, Ronald, I et al.; Dike, Bronstein, Roberts & Cushman, L.L.P., 130 Water Street, Boston, MA 02109-4280 (US).		(81) Designated States: AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report.</i>
(54) Title: TREATMENT OF HUMAN PROSTATE DISEASE WITH BETA-LAPACHONE DERIVATIVES		
(57) Abstract <p>We have now discovered that unexpectedly compounds of formulae (I) or (II) can be used to selectively stimulate the death of mammalian prostate cells, including both epithelial cell and prostate cancer cells, and thus are useful in treating prostate diseases, wherein R and R₁ are each independently selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy, thio (SH), halogen, substituted and unsubstituted alkyl, substituted and unsubstituted alkenyl, substituted and unsubstituted aryl, and substituted and unsubstituted alkoxy, and salts thereof, wherein the dotted double bond between the ring carbons to which R and R₁ are bonded represent an optional ring double bond. Preferred compounds of formula (I) include those in which at least one of the substituents R and R₁ is hydrogen and/or at least one said substituents is allyl. Specifically preferred compounds include β-lapachone (i.e., R and R₁, both being hydrogen), allyl-β-lapachone, particularly 3-allyl-β-lapachone (i.e. R being allyl and R₁ being hydrogen) and 3-bromo-β-lapachone (i.e. R being bromo and R₁ being hydrogen).</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div data-bbox="1015 1171 1339 1344"> <p style="text-align: right;">(I)</p> </div> <div data-bbox="1023 1417 1347 1585"> <p style="text-align: right;">(II)</p> </div> </div>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

TREATMENT OF HUMAN PROSTATE DISEASE WITH BETA-LAPACHONE DERIVATIVES

BACKGROUND OF THE INVENTION

The present invention is directed to a method of treating an individual suffering from benign prostate hyperplasia and prostate cancer.

5 The prostate gland produces several components of semen in blood and several regulatory peptides. The prostate gland comprises stroma and epithelium cells, the latter group consisting of columnar secretory cells and basal non-secretory cells. The proliferation of these basal cells, as well as stroma cells gives rise to benign prostatic
10 hyperplasia (BPH) which is one common prostate disease. BPH is a progressive condition which is characterized by the nodular enlargement of the prostatic tissue resulting in obstruction of the urethra. This results in increased frequency of urination, noncuria, poor urine stream, and hesitation or delay in starting the urine flow. Consequences of BPH can
15 include hypertrophy of bladder smooth muscle, decompensated bladder, and increased incidence of urinary tract infection. The development of BPH is considered to be an escapable phenomenon for the aging male population. BPH is observed in approximately 70% of males over the age of 70. Currently in the United States, the method of choice for
20 treating BPH is surgery, e.g., transurethral recession of the prostate. There is no adequate therapeutic drug treatment for BPH.

Another common prostate disease is prostatic adenocarcinoma (CaP) or androgen independent prostate cancer, which involves

malignant transformation of epithelial cells in the peripheral region of the prostatic gland. Androgen independent prostate cancer is presently the most common cancer in men in the United States with 38,000 deaths anticipated for the USA in 1994, and is a significant condition worldwide. Approximately 50% of patients are presented with metastatic disease. However, the only existing treatment for metastatic disease is hormonal therapy, which is not curative. Thus, the metastatic disease is typically fatal.

Hormonal therapy consisting of different approaches to blocking the action of androgen on the prostate tumor is effective in controlling only the growth of tumor cells that depend on androgen for growth (hormone-dependent tumor). Unfortunately, hormone-dependent tumor inevitably progresses to more advanced hormone-independent tumor, which cannot be controlled by current treatment. Difficulties in treating prostate cancer arise from a variety of reasons. Although such androgen ablation is a standard therapy for metastatic prostate cancer it is rarely entirely successful because in most individuals the cancer is heterogeneous comprising both androgen dependent and androgen independent cancer cells. Thus, the therapy does not eliminate the androgen independent cells.

Chemotherapy, which has been used to treat a number of other cancers, has not proven successful. This is because the vast majority of these androgen independent cells are not actively proliferating and standard chemotherapeutic agents work by selectively killing actively proliferating cells.

Radiation therapy, which also is selective for rapidly proliferating cells, has also not proven effective. Surgery has also not proven an

effective means for treating advanced disease states. Accordingly, it would be desirable to have new methods for stimulating the death of these slow proliferating cancer cells. It would be particularly desirable to have a new means of treating individuals suffering from prostate cancer, particularly androgen independent cancer.

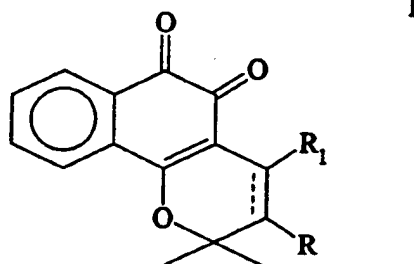
β -lapachone (3,4-dihydro-s,3-dimethyl-2H-naphthol[1,3-b] pyran-5,6-clone) is a simple plant product with a chemical structure different from currently used anti-cancer drugs. It is obtained by sulfuric acid treatment of the naturally occurring lapachol, which is readily isolated from *Tabebuia avellanedae* growing mainly in Brazil, or is easily synthesized from lomatol, isolated from seeds of *lomatia* growing in Australia (Hooker, S., et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 58:1181-1190 (1936); Goncalves de Lima, O., et al., *Rev. Inst. Antibiot. Univ. Recife*. 4:3-17 (1962)).

β -lapachone has been shown to have a variety of pharmacological effects. β -lapachone is a topoisomerase I inhibitor but acts by a different mechanism than camptothecin. Numerous β -lapachone derivatives have been synthesized and tested as anti-viral and anti-parasitic agent (Goncalves, A.M., et al., *Mol. Biochem. Parasitology*, 1:167-176 (1980); Schaffner-Sabba, K., et al., *J. Med. Chem.*, 27:990-994 (1984); Li, C., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:18?-1842 (1993)). β -lapachone and its derivatives, e.g. 3-allyl- β -lapachone, show anti-trypanosomal effects (Goncalves, A.M., et al., *supra*), the mechanism of which is unclear. It significantly prolongs the survival of mice infected with Rauscher leukemia virus, probably through inhibition of reverse transcriptase (Schaffner-Sabba, K., et al., *supra*; Schuerch, A.R., et al., *J. Biochem.*, 84:197-205 (1978)). We taught that β -lapachone also inhibits gene expression directed by the long terminal repeat (LTR) of the

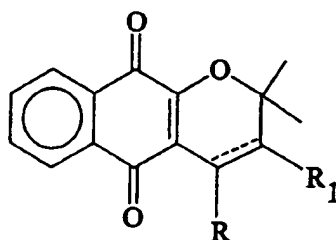
human immunodeficiency virus type 1, and viral replication (Li, C., et al., *supra*). β -lapachone has also been shown to be a DNA repair inhibitor which sensitizes cells to DNA damaging agents (Boorstein, R.J., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 118:828-834, (1984); Boothman, D.A., et al., *J. Cancer Res.*, 49:605-612 (1989)). β -lapachone is well tolerated in dogs, rats, mice, and chickens. The maximum tolerated dose, when given p.o daily for one month, is 200 mg/kg in rats, and 100 mg/kg in dogs. Higher doses cause gastric ulceration and loss of erythrocytes, but not signs of bone marrow suppression (Ciba-Geigy, personal communication). The previous experience with this compound in humans has been limited.

SUMMARY OF THE INVENTION

We have now discovered that unexpectedly compounds of the following formulae I and II can be used to selectively stimulate the death of mammalian prostate cells, including both epithelial cell and androgen dependent and independent prostate cancer (CaP) cells, and thus are useful in treating prostate diseases:



5



5

wherein R and R₁ are each independently selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy, thio (SH), halogen, substituted and unsubstituted alkyl, substituted and unsubstituted alkenyl, substituted and unsubstituted aryl, and substituted and unsubstituted alkoxy, and salts thereof, wherein the dotted double bond between the ring carbons to which R and R₁ are bonded represent an optional ring double bond. Preferred compounds of formula I include those in which at least one of the substituents R and R₁ is hydrogen and/or at least one of said substituents is allyl. Specifically preferred compounds of formula I include β -lapachone (i.e., R and R₁ both being hydrogen), allyl- β -lapachone, particularly 3-allyl- β -lapachone (i.e. R being allyl and R₁ being hydrogen) and 3-bromo- β -lapachone (i.e. R being bromo and R₁ being hydrogen).

20

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the effect of β -lapachone on survival of human prostate cancer cells O, PC-3 cells; O, DU145 cells. Cell survival was determined by the colony formation assay described below.

25

Figures 2A, 2B, 2C and 2D show induction of apoptosis by β -lapachone in human prostate cancer cells. DNA laddering, typical feature of apoptosis, was induced in PC-3, D 145 (2A) and LNCaP cells (2B). In 2A, cells were treated with 4 μ M β -lapachone for 4 hours,

30

followed by incubation in drug-free medium for 4 hours (lane 2,7), 12 hours (lane 3,8), 20 hours (lane 4,9), 44 hours (lane 5, 10). As controls, cells were treated with equal volume of DMSO (lane 1,6). DNA was extracted and subjected to electrophoresis. In 2B, LNCaP cells were treated with β -lapachone for 4 hours at concentrations of 0 μ M (lane 1), 0.5 μ M (lane 2), 2 μ M (lane 3), 4 μ M (lane 4), followed by drug free incubation for 20 hours. To quantify apoptotic fraction, LNCaP cells were treated with or DMSO (2C) or 8 μ M β -lapachone (2D) for 1 hour, followed by incubation in drug-free media for 23 hours before they were subjected to flow cytometric analysis.

Figure 3 shows lack of correlation between β -lapachone induced apoptosis and the expression of p53 and bcl-2. A. Expression pattern of p53 and bcl-2 in DU-145 cells (lane 1) and PC-3 cells (lane 2). B, β -lapachone did not induce expression of p53 and p21. Lane 1 to 4: PC-3 cells; lane 5 to 8: DU-145 cells. Cells were treated with DMSO (lane 1,5), or β -lapachone at 2 μ M (lane 2,6), 4 μ M (lane 3, 7) and 8 μ M (lane 4, 8) for 1 hour, followed by incubation in drug free media for 23 hours. Expressions of p53, p21, and bcl-2 were determined by Western blot assay as described below.

Figures 4A, 4B, and 4C shows induction of apoptosis (A) and differentiation in HL-60 cells (B,C) by β -lapachone. In 4A, HL-60 cells were treated with 8 μ M β -lapachone for 24 hours (lane 1). 16 hours (lane 2), 8 hours (lane 3), 4 hours (lane 4), 2 hours (lane 5), 0 hours (lane 6). Cellular DNA was extracted and subjected to gel electrophoresis. To analyze morphological changes induced by β -lapachone, HL-60 cells were treated with ethanol (1/1000, v/v) (4B) or 0,8 μ M β -lapachone dissolved in ethanol (4C) for 6 days before harvest.

A thin film of cells were spread on a slide, and stained with modified Wright-Giemsa Stain (Sigma).

Figure 5 shows the effect of β -lapachone on tumor volume. The bar represents episodes of administration of β -lapachone.

5

Figure 6 shows the effect *in vivo* of β -lapachone on prostate tumors AT-3.1.

Figure 7 shows the effect *in vivo* of β -lapachone on prostate tumors AT-3.1.

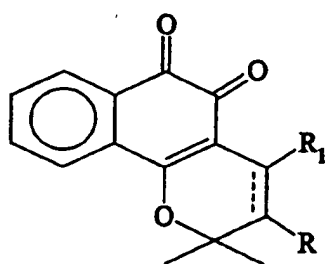
10

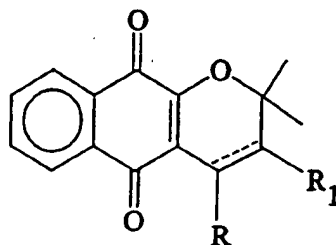
DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

We have now discovered that unexpectedly compounds of the following formulae I and II can be used to stimulate the death of mammalian prostate cells including both epithelial and androgen dependent and independent prostate cancer (CaP) cells. The mammal is preferably a human. Thus, the compounds having the following formulae are useful in treating prostate diseases:

20

25





5 wherein R and R₁ are each independently selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy, thio (SH), halogen (e.g. fluoro, chloro and bromo), substituted and unsubstituted aryl, substituted and
10 unsubstituted alkenyl, substituted and unsubstituted alkyl and substituted and unsubstituted alkoxy, and salts thereof, wherein the dotted double bond between the ring carbons to which R and R₁ are bonded represent an optional ring double bond. The alkyl groups
15 preferably have from 1 to about 15 carbon atoms, more preferably from 1 to about 10 carbon atoms, still more preferably from 1 to about 6 carbon atoms. As used herein, the term alkyl unless otherwise modified refers to both cyclic and noncyclic groups, although of course cyclic groups will comprise at least three carbon ring members. Straight or
20 branched chain noncyclic alkyl groups are generally more preferred than cyclic groups. Straight chain alkyl groups are generally more preferred than branched. The alkenyl groups preferably have from 2 to 15 carbon atoms, more preferably from 2 to about 10 carbon atoms, still more preferably from 2 to about 6 carbon atoms. Especially preferred alkenyl
25 groups have 3 carbon atoms (i.e., 1-propenyl or 2-propenyl), with the allyl moiety being particularly preferred. Phenyl and naphthyl are generally preferred aryl groups. Alkoxy groups include those alkoxy groups having one or more oxygen linkage and preferably have from 1 to 15 carbon atoms, more preferably from 1 to about 6 carbon atoms. Said
30 substituted R and R₁ groups may be substituted at one or more available

positions by one or more suitable groups such as, for example, alkyl groups such as alkyl groups having from 1 to 10 carbon atoms or from 1 to 6 carbon atoms, alkenyl groups such as alkenyl groups having from 2 to 10 carbon atoms or 2 to 6 carbon atoms, aryl groups having from 6 to 10 carbon atoms, halogen such as fluoro, chloro and bromo, and N, O and S, including heteroalkyl, e.g., heteroalkyl having one or more of said hetero atom linkages (and thus including alkoxy, aminoalkyl and thioalkyl) and from 1 to 10 carbon atoms or from 1 to 6 carbon atoms.

As the experiments discussed below show, the compounds of formulae I and II are useful in suppressing survival in human ovary and breast cells, and are thus useful in treating ovarian and breast cancer.

Compounds of formulae I and II can readily be made or obtained. (See Pardee, A., et al., *Cancer Research*, 49, 1-8 (1989); Schaffner-Sabba, K., et al., *Journal of Medicinal Chemistry*, 27, no. 8 990-994 (1984); S. Hooker, 58, 1181-1197 (1936).

Preferred compounds of formula I include β -lapachone, 3-allyl- β -lapachone, 3-bromo- β -lapachone and 3-OH- β -lapachone, 3-allyl- β -lapachone and 3-bromo- β -lapachone are more preferred.

Preferred compounds of formula II include 3-bromo-alpha-lapocleone (compound 4 of Table 1).

We have tested a variety of human cancer cells for their sensitivity to compounds of formulae I and II, e.g. β -lapachone, a novel inhibitor of DNA topoisomerase I (Li, C.J., et al., *supra*). Human prostate cancer cells were the cancer cells that was most sensitive to β -lapachone and its derivatives, these compounds exhibiting enhanced death rates. We

believe these cells were induced to undergo a process of programmed cell death (apoptosis) specifically activated in prostate cells after they are deprived of testosterone (Martikainen, P., et al., *Cancer Res.* 51:4693-4700 (1991)). Results in the nude mouse model demonstrate that

5 compounds of formulae I and II such as β -lapachone can inhibit human prostate tumor growth. This compound also causes suppression of survival, albeit at slightly higher concentrations, in human ovary and breast cells. However, typical apoptosis was not detected in any other

10 human cancer cells of epithelial origins including colon, kidney, lung, breast, or ovary exposed to the drug other than the prostate cells. Human hematopoietic leukemia cells (HL-60) were induced to undergo either apoptosis or differentiation depending on the concentration used.

The prevalence of p53 inactivation and/or bcl-2 expression in

15 human tumors is generally believed to be at least partially responsible for the general ineffectiveness of current chemo- and radiation therapy for cancer (Berchem, G.J., et al., *Cancer Res.* 55:735-738 (1995); Lowe, S., et al., *Science* 266:807-810 (1994)). It is thus important to develop novel anti-cancer drugs that induce cell death in a p53 independent

20 manner. One way such compounds could work is through activation of p53 targeting genes, e.g. p21 (SDI1/WAF1/Cip1), by a p53 independent pathway (Johnson, M., et al. *Mol. Carcinogenesis* 11:59-64 (1994)). We have shown that compounds of formulae I and II such as β -lapachone and its derivatives induced apoptosis in the absence of p53

25 expression (Fig. 3A) indicating that it may be p53 independent. There was no significant induction of p53 and p21 (Fig. 3B) in human prostate cancer cells during apoptosis, suggesting that the induced apoptosis occurs independent of the p53 pathway. β -lapachone and its derivatives induced cell death that also did not correlate with bcl-2 expression and

30 was not protected by ectopically overexpressed bcl-2. These results

thus indicate the existence of a cell death program independent of both p53 and bcl-2 can be activated by compounds of formula I and II such as β -lapachone and its derivatives.

5 We have also treated human non-tumor prostate epithelial cells with β -lapachone and found that their proliferative ability was completely halted at concentrations as low as 1-2 μ M. Epithelial cancer cells from colon, kidney, lung, and other cell lines, are generally resistant to β -lapachone (10 to 100 μ M) (Boorstein, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 828-834 (1984); Boothman, et al. *Cancer Res.* 47, 10 5361-5366 (1987)).

 In general, for the treatment of androgen independent prostate cancer, a suitable effective dose of one or more compounds of formulae I
15 or II will be preferably in the range of 10 to 500,000 μ g per kilogram body weight of recipient per day, more preferably in the range of 1000 to 50,000 μ g per kilogram body weight per day, most preferably in the range of 5000 to 25,000 μ g per kilogram body weight per day. The
20 desired dose is suitably administered once or several more sub-doses administered at appropriate intervals throughout the day, or other appropriate schedule. These sub-doses may be administered as unit dosage forms, for example, containing 1 to 20,000 μ g, preferably 10 to 10,000 μ g per unit dosage form.

25 Accordingly, one would use an effective amount of these compounds in a method to stimulate the death of prostate tumor cells, particularly androgen independent prostatic tumor cells. One would select a subject having prostatic tumor cells and administer an effective amount of one of the compounds of formulae I or II such as 3-allyl- β -
30 lapachone, 3-halo- β -lapachone or β -lapachone to treat the prostatic

tumor cell. Preferably, the subject is a human. Still more preferably, the human has CaP.

5 In treating metastatic disease, because selective nature of the compounds of formulae I and II, one can administer the compounds intravenously.

10 Administration of the compounds of the invention may be by any suitable route including oral, rectal, nasal, vaginal, topical (including buccal and sublingual), and parenteral (including subcutaneous, intramuscular, intravenous and intradermal) with oral or parenteral being preferred. It will be appreciated that the preferred route may vary with, for example, the condition and age of the recipient.

15 The administrative ingredients may be used in therapy in conjunction with other medicaments.

20 While one or more compounds of formulae I or II may be administered alone, they also may be present as part of a pharmaceutical composition. The compositions of the invention comprise at least one compound of formulae I or II together with one or more acceptable carriers thereof and optionally other therapeutic ingredients, including those therapeutic agents discussed *supra*. The carrier(s) must be "acceptable" in the sense of being compatible with the other ingredients
25 of the formulation and not deleterious to the recipient thereof.

The compositions include those suitable for oral, rectal, nasal, topical (including buccal and sublingual) or parenteral (including subcutaneous, intramuscular, intravenous and intradermal)
30 administration. The compositions may conveniently be presented in unit

dosage form, e.g., tablets and sustained release capsules, and in liposomes and may be prepared by any methods well known in the art of pharmacy.

5 Such methods include the step of bringing into association the to be administered ingredients with the carrier which constitutes one or more accessory ingredients. In general, the compositions are prepared by uniformly and intimately bringing into association the active ingredients with liquid carriers, liposomes or finely divided solid carriers
10 or both, and then if necessary shaping the product.

 Compositions of the present invention suitable for oral administration may be presented as discrete units such as capsules, cachets or tablets each containing a predetermined amount of the active
15 ingredient; as a powder or granules; as a solution or a suspension in an aqueous liquid or a non-aqueous liquid; or as an oil-in-water liquid emulsion or a water-in-oil liquid emulsion or packed in liposomes and as a bolus, etc.

20 A tablet may be made by compression or molding, optionally with one or more accessory ingredients. Compressed tablets may be prepared by compressing in a suitable machine the active ingredient in a free-flowing form such as a powder or granules, optionally mixed with a binder, lubricant, inert diluent, preservative, surface-active or dispersing
25 agent. Molded tablets may be made by molding in a suitable machine a mixture of the powdered compound moistened with an inert liquid diluent. The tablets may optionally be coated or scored and may be formulated so as to provide slow or controlled release of the active ingredient therein.

Compositions suitable for topical administration include lozenges comprising the ingredients in a flavored basis, usually sucrose and acacia or tragacanth; pastilles comprising the active ingredient in an inert basis such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia; and mouthwashes
5 comprising the ingredient to be administered in a suitable liquid carrier.

Compositions suitable for topical administration to the skin may be presented as ointments, creams, gels and pastes comprising one or more compounds of formulae I or II and a pharmaceutically acceptable carrier.
10 A suitable topical delivery system is a transdermal patch containing the ingredient to be administered.

Compositions suitable for rectal administration may be presented as a suppository with a suitable base comprising, for example, cocoa
15 butter or a salicylate.

Compositions suitable for nasal administration wherein the carrier is a solid include a coarse powder having a particle size, for example, in the range 20 to 500 microns which is administered in the manner in
20 which snuff is taken, i.e., by rapid inhalation through the nasal passage from a container of the powder held close up to the nose. Suitable formulations wherein the carrier is a liquid, for administration, as for example, a nasal spray or as nasal drops, include aqueous or oily solutions of the active ingredient.

25

Compositions suitable for vaginal administration may be presented as pessaries, tampons, creams, gels, pastes, foams or spray formulations containing in addition to the active ingredient such carriers as are known
in the art to be appropriate.

30

Compositions suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous steril injection solutions which may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes which render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient; and

5 aqueous and non-aqueous sterile suspensions which may include suspending agents and thickening agents. The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampules and vials, and may be stored in a freeze dried (lyophilized) condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier, for

10 example, water for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions may be prepared from sterile powders, granules and tablets of the kind previously described.

To ensure solubility, the compounds are preferably dissolved in a

15 non-ionic solubilizer such as an ethylene oxide ester-ether and fatty acid glycerides commercially available as Cremphor EL (BASF).

It should be understood that in addition to the ingredients particularly mentioned above the formulations of this invention may

20 include other agents conventional in the art having regard to the type of formulation in question, for example, those suitable for oral administration may include flavoring agents.

All documents mentioned herein are incorporated herein by

25 reference.

The present invention is further illustrated by the following examples. These examples are provided to aid in the understanding of the invention and are not construed as a limitation thereof.

30

EXAMPLESGeneral Comments

The following reagents and procedures were employed as specified in the examples.

5

Chemicals

β -lapachone was kindly provided by Dr. A. Matter (CIBA-GEIGY Ltd., Switzerland). It was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 20 mM concentration, aliquoted, and kept at -20°C.

10

Cell Cultures

All cell lines used in this study are obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD.) unless specified otherwise. Cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ in complete humidity. Human prostrate tumor cells PC-3, DU145, and LNCaP were grown in Dulbecco's modified Eagle's Medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. HL-60 (human promyelocytic leukemia cell line) was cultured in RPMI medium with 10% heat inactivated FCS. MCF-7 and 21 MT (human breast epithelial cell line), kindly provided by Dr. R. Sager (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA), were cultured in MEM alpha medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, and 1mg/ml insulin. AD 2780s (human ovary carcinoma), a generous gift from Dr. K.J. Scanlon (City of Hope Medical Center, Duarte), 293 (human kidney epithelial cell line), SW1116 (human colon adenocarcinoma), and human lung carcinoma cell lines (H596, H520) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% FCS and 2 mM L-glutamine. Hela and Hela-bcl-2 cells (Meikrantz,

30

W., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3754-3758 (1994), kindly provided by Drs. W. Meikrantz and R. Schlegel (Harvard School of Public Health, Boston, MA), were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Inc.) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, and 800 μ g/ml of G418.

Colony Formation Assay

Exponentially growing cells were seeded (2000 cells/dish) in 60 mm culture dishes and allowed to attach for 48 hours. B-lapachone was added in less than 5 μ l volume (corresponding to a final DMSO concentration of less than 0.1%) directly to dishes from concentrated working solutions in DMSO. Control dishes received DMSO alone at equal volume. After 1 to 4 h, cells were rinsed and drug free medium was added to the cells. Cultures were observed daily for 10 to 20 days, cells were fixed and stained with modified Wright-Giemsa Stain (Sigma). Colonies of greater than 30 cells were scored as survivors.

Agarose Gel Electrophoresis of Apoptotic DNA

The method of Wesselborg, S., et al., *J. Immunol.*, 150:4338 (1993) was used. Cells were treated with β -lapachone, and then incubated in drug-free media. They were harvested and lysed in 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, 0.5 mg/ml proteinase K, and 0.15 ng/ml RNase. The supernatant of the cell lysate was loaded onto a 2% agarose gel. The electrophoresis was carried out at 24 V for 16 hours. The gel was stained with ethidium bromide. A Polaroid picture was taken after detaining the gel for 1 hour.

Flow Cytometry Analysis

Cytofluorometric analysis of apoptosis and cell cycle analysis was performed by propidium iodide staining of nuclei as reported previously (Li, C.J., et al., *Science* 268:429-431 (1995)).

5 Western Blot Analysis

Nuclear extract was prepared from exponentially growing cells (Dignam, J.D., et al., *Nucleic Acids Res.*, 11:1475 (1983)). The ECL assay system was used to detect p53 and bcl-2 levels. Briefly, nuclear protein samples (10 μ g per sample) were electrophoresed in a sodium
10 dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. The blot was blocked, washed, and incubated with p53, bcl-2, or p21 (Cip1/Waf1) antibody (Oncogene Science, Cambridge, MA) at 1:1000 dilution. The filter was then incubated with a secondary antibody that was conjugated with
15 horseradish peroxidase. Finally, the filter was developed with detection reagents (RPN 2109:Amersham) and exposed to a hyperfilm-ECL (RPN 2103).

Animal Administration

20 In the *in vivo* animal experiments, β -lapachone was formulated into solution with Cremophor EL (BASF).

Example 1

Effects of β -Lapachone on Prostate Weight

25 Rats in the treated group received β -lapachone at 50 mg/kg i.p.. After treatment the average prostate weight was 345 ± 72 g for control rats, and 203 ± 19 g treated animals. Statistical analysis showed a significant decrease in prostate weight ($p0.000002$). These results demonstrate that β -lapachone induced shrinkage of the prostate gland.

Example 2Effects of β -Lapachone on Survival of Human Cancer Cells

Human carcinoma cell lines of different histotypes were used to test the anti-survival effect of β -lapachone. Androgen independent human prostate tumor cells PC-3 and DU145 were treated with β -lapachone *in vitro*. Cell survival was determined by colony formation assay, β -lapachone inhibits proliferation of both cell lines with an IC_{100} of 4 to 8 μ M (Figure 1). LNCaP cells were equally sensitive to β -lapachone. 21 MT (a human breast carcinoma cell line) and AD2780s (a human ovary carcinoma cell line) were also relatively sensitive to the antiproliferative effect of β -lapachone (IC_{100} , 16 μ M). Proliferation of SW116, a human colon adenocarcinoma cell line, was not significantly inhibited by β -lapachone up to 128 μ M, the maximum concentration used. Other cell lines tested, which included H596, H520 (human lung carcinoma cell lines) and 293 (a human kidney epithelial cell line) were also relatively resistant to β -lapachone ($IC_{100} > 32\mu$ M).

Seventeen derivatives of β -lapachone were tested in PC-3 and DU145 cells in the manner described above. 3-allyl- β -lapachone and 3-bromo- β -lapachone were found to be more active than β -lapachone against prostate cells (Table 1).

TABLE 1

Antisurvival effect of β -lapachone and its derivatives against human prostate cancer cells

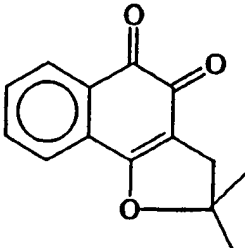
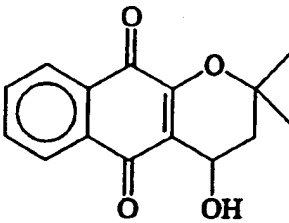
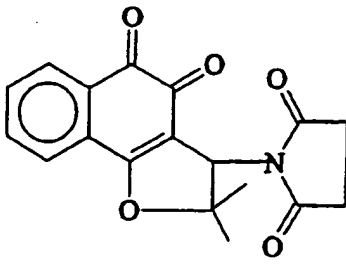
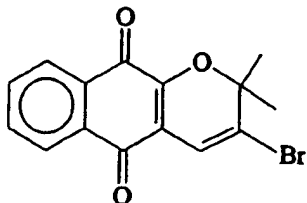
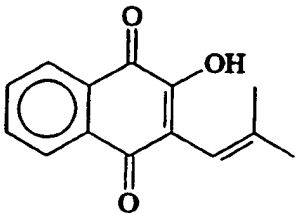
β -lapachone and derivatives	Activity
<p>1</p> 	+/-
<p>2</p> 	+/-
<p>3</p> 	+/-

TABLE 1 (Cont.)

Antisurvival effect of β -lapachone and its derivatives against human prostate cancer cells

β -lapachone and derivatives	Activity
<div>4 *</div>  <chem>C[C@H]1C(Br)C=C[C@@H]2C(=O)C(=O)c3ccccc3C2=O1</chem>	+++
<div>5</div>  <chem>CC(C)=CC[C@H]1C(O)C(=O)C(=O)c2ccccc2C1=O</chem>	+/-

+++

TABLE 1 (Cont.)

Antisurvival effect of β -lapachone and its derivatives against human prostate cancer cells

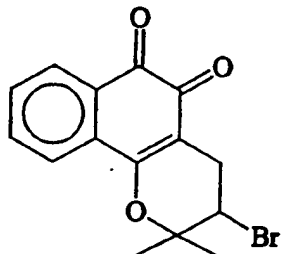
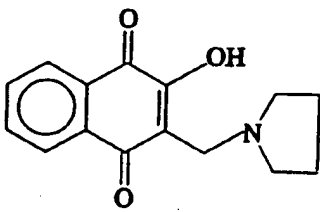
β -lapachone and derivatives	Activity
<p>6</p> 	++++
<p>7</p> 	+/-

TABLE 1 (Cont.)

Antisurvival effect of β -lapachone and its derivatives against human prostate cancer cells

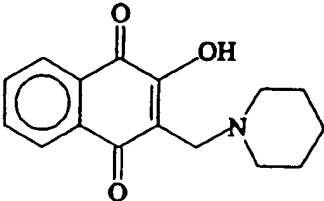
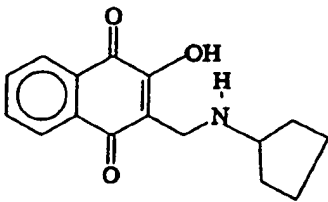
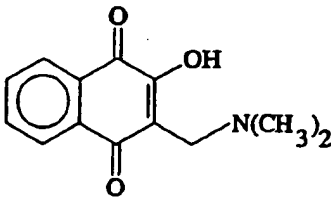
β -lapachone and derivatives	Activity
<p>8</p> 	+/-
<p>9</p> 	+/-
<p>10</p> 	+/-

TABLE 1 (Cont.)

Antisurvival effect of β -lapachone and its derivatives against human prostate cancer cells

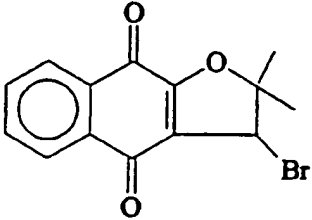
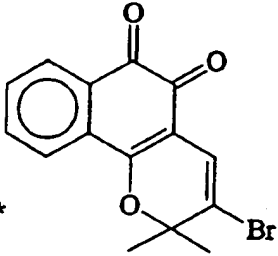
β -lapachone and derivatives	Activity
<p>11</p> 	+/-
<p>12*</p> 	++

TABLE 1 (Cont.)

Antisurvival effect of β -lapachone and its derivatives against human prostate cancer cells

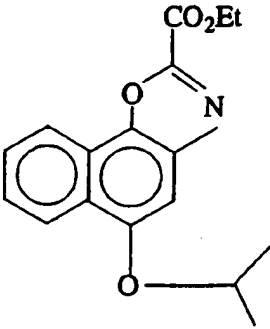
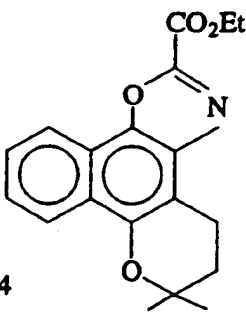
β -lapachone and derivatives	Activity
<p>13</p>  <chem>CCOC(=O)C1=CN=C2C(=C1)C(OC(C)C)=CC3=CC=CC=C23</chem>	+/-
<p>14</p>  <chem>CCOC(=O)C1=CN=C2C(=C1)C(OC3=CC=CC=C3C4(C)CCOC4)=CC5=CC=CC=C25</chem>	+/-

TABLE 1 (Cont.)

Antisurvival effect of β -lapachone and its derivatives against human prostate cancer cells

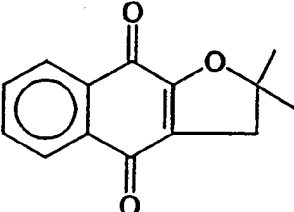
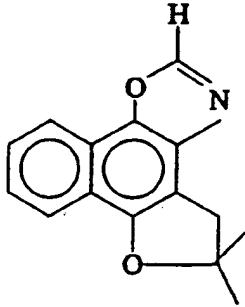
β -lapachone and derivatives	Activity
<div>15</div> 	+/-
<div>16</div> 	+/-

TABLE 1 (Cont.)

Antisurvival effect of β -lapachone and its derivatives against human prostate cancer cells

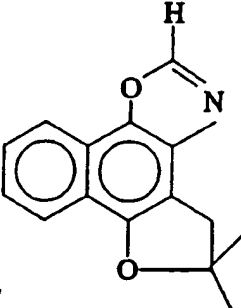
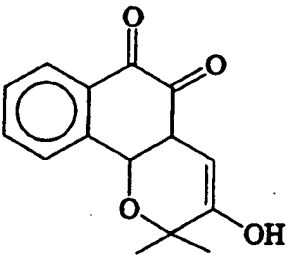
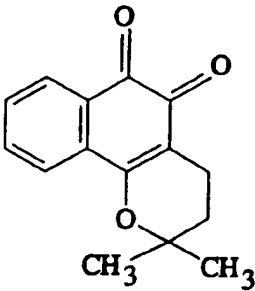
β -lapachone and derivatives	Activity
<div></div> <p>17</p>	+/-
<div></div> <p>18*</p>	+/-

TABLE 1 (Cont.)

Antisurvival effect of β -lapachone and its derivatives against human prostate cancer cells

β -lapachone and derivatives	Activity
<div><p>19*</p></div>	++

* Compound of the present invention.

Example 3

Induction of Apoptosis by β -Lapachone in Human Prostate Cancer Cells.

5 Extensive cell death was observed in proliferating human prostate cancer cells after treatment with β -lapachone. To determine whether this cell death occurs through necrosis or apoptosis, cells were harvested by trypsinization and their genomic DNA was subjected to gel
10 electrophoresis. As shown in Fig. 2A and 2B, β -lapachone induced a typical DNA laddering in human prostate cancer cells, consistent with cell death by apoptosis, a process that is specifically activated in

prostate cells after they are deprived of testosterone (Kyprianou, N., et al., *Cancer Surv.*, 11:265-77, (1991)). This β -lapachone induced apoptosis was observed in every prostate cell line tested, including PC-3, DU145, and LNCaP. To test whether quiescent cells are similarly sensitive to β -lapachone, both PC-3 and DU145 cells were serum starved for 48 hours before drug treatment. Apoptosis was similarly induced in non-proliferating cells (data not shown). To determine the percentage of apoptotic cells, the fraction of sub-G1 cells was quantitated with flow cytometry analysis. As shown in Fig. 2C, β -lapachone induced apoptosis in 68% of LNCaP cells by 24 hours after initial treatment with β -lapachone. In PC-3 cells, apoptosis occurs in 62% by 24 hours (data not shown). Apoptosis, as determined by DNA laddering and chromosome condensation, was not detected in β -lapachone treated 21-MT (human breast epithelial cell line), H520 (human lung carcinoma cell lines), SW1116 (human colon adenocarcinoma), A2780s (human ovary carcinoma) cells.

Example 4

Apoptosis Induced by β -Lapachone is Independent of Expression of p53 and bcl-2.

Expression of bcl-2 has been implicated in the resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs including prostate cells (Berchem, G.J., et al., *Cancer Res.* 55:735-738 (1995)). To determine whether apoptosis in prostate cancer cells is due to lack of bcl-2 expression, we measured bcl-2 expression by Western blot assay. As shown in Fig. 3, bcl-2 expression is high in PC-3 and low in DU145 cells, which does not correlate with their sensitivity to β -lapachone induced apoptosis. HeLa cells with ectopic overexpression of bcl-2 (hela-bcl-2) (Meikrantz, W., et al., *supra*) was not significantly resistant to β -lapachone in comparison

with its parental cell line (IC100 was 16 μ M in parental cells, and 32 μ M in Hela-bcl-2 cells) (data not shown).

p53 status has been shown to be important for apoptosis in
5 cancer cells provoked by ionizing radiation and chemotherapeutic drugs
(Lowe, S., et al., *Science* 266:807-810 (1994)). p 53 was expressed in
DU145 cells, but was not detectable in PC-3 cells (Fig. 3A), although
apoptosis was induced in both cell lines (Fig. 2A). β -lapachone
treatment did not significantly induce expression of p53 (Fig. 3B). These
10 results suggest that apoptosis induced by β -lapachone is not dependent
on P53 expression. Expression of p21 is not significantly upregulated in
prostate cancer cells undergoing apoptosis (Fig. 3B).

The effect of β -lapachone was also tested in hematopoietic cancer
15 cells. Treatment of HL-60 (p53 -), a human leukemia cell line, with β -
lapachone also induced apoptosis. Chromosomal laddering was
detectable with 4 hours after β -lapachone treatment (Fig. 4A). At sub-
apoptotic doses, β -lapachone induced an increase in the G1 fraction
(data not shown) and morphological in HL-60 cells (Fig. 4B).

20

Example 5

Inhibition of Human Prostate Tumor Growth *In Vivo*

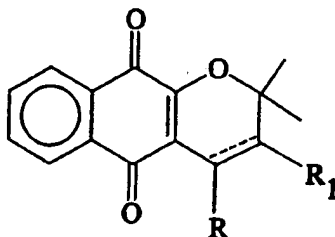
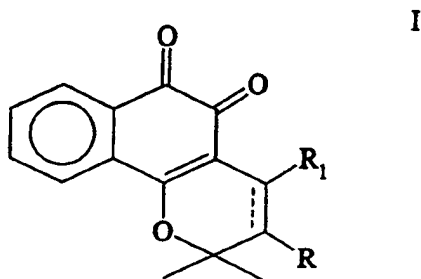
β -lapachone was tested against human prostate tumor in nude
mice. A hormone refractory human prostate adenocarcinoma cell line
25 (PC-3) was inoculated into nude mice. Treatment was initiated when
tumor reached 100 to 250 mm³. Without drug treatment (mouse 5), the
tumor grew rapidly and the mouse died when the tumor reached about
400 mm³ (Fig. 5). β -lapachone, given at 500 mg/kg, stopped tumor
growth (mouse 2, Fig. 5). At intermediate dosage (250 mg/kg, mouse 1
30 and 3), β -lapachone also showed intermediate inhibition on tumor growth

(Fig. 5). Mouse 4 did not develop an appreciable tumor mass under the treatment with β -lapachone (500 mg/kg). No sign of drug toxicity was observed.

- 5 In addition, the *in vivo* efficacy of β -lapachone were determined in a widely used prostate tumor model, Dunning R-3327 rat prostate adenocarcinoma. A highly metastatic and malignant clone (RT-3.1) of Dunning R-3327 prostate adenocarcinoma cells were inoculated into Copenhagen rats. Solid tumor masses were formed one week later.
- 10 Rats in treatment group received one dose of β -lapachone at 50 mg/ml, i.p. Tumor necrosis was observed 24 hours after drug treatment in every treated rats, but not in untreated controls. Tumor volume was measured. The results are set forth in Figures 6 and 7.
- 15 The invention has been described in detail with reference to preferred embodiments thereof. However, it will be appreciated that those skilled in the art, upon consideration of this disclosure, may make modifications and improvements within the spirit and scope of the invention.

What is claimed is:

1. A method of treating benign prostate hyperplasia in a human comprising administering to said human an effective treatment amount of a compound of the following formulae I or II:



wherein R and R₁ are each independently selected from the group consisting of hydrogen, hydroxy, thio (SH), halogen, substituted and unsubstituted alkyl, substituted and unsubstituted alkenyl, substituted and unsubstituted aryl, and substituted and unsubstituted alkoxy, and salts thereof, wherein the dotted double bond between the ring carbons to which R and R₁ are bonded represent an optional ring double bond.

2. The compound described in claim 1, wherein at least one of R and R₁ is hydrogen.

3. The compound described in claim 1, wherein at least one of R and R₁ is alkenyl.
4. The compound described in claim 1, where at least one of R and R₁ is allyl.
5. The compound described in claim 1, where the compound of formula I is selected from the group consisting of β -lapachone, 3-allyl- β -lapachone, 3-OH- β -lapachone and 3-bromo- β -lapachone.

FIG. 1

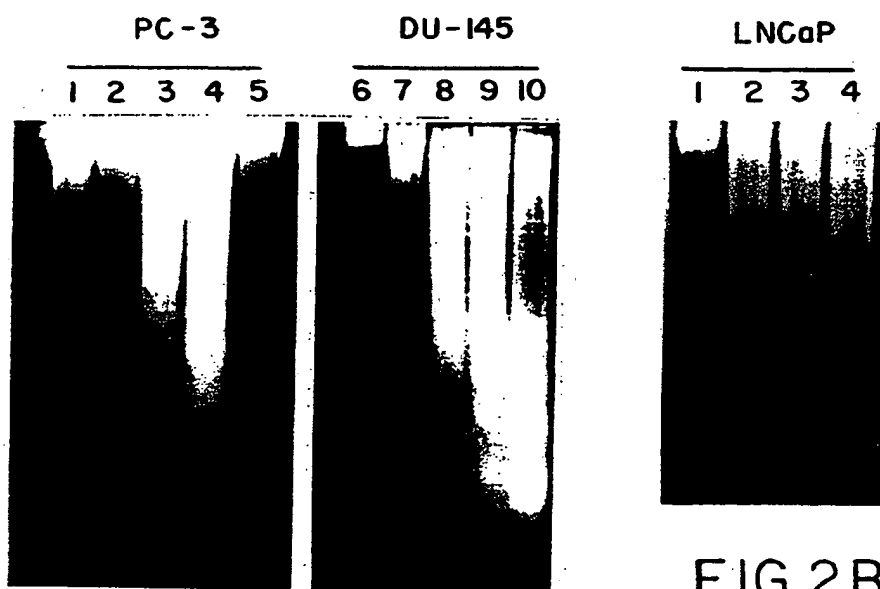
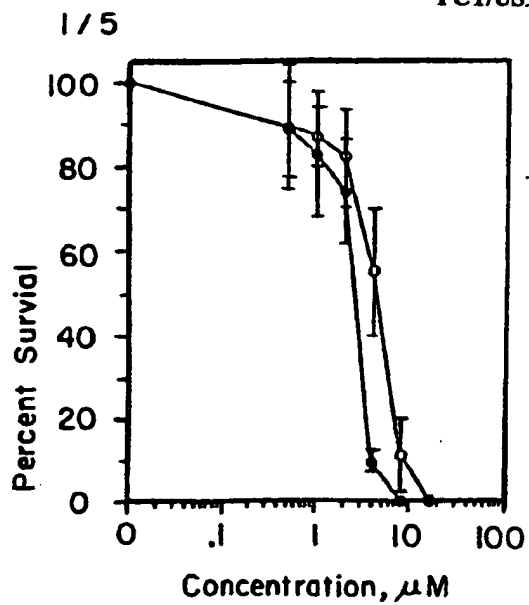


FIG.2A

FIG.2B

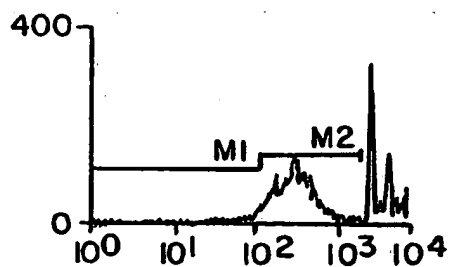


FIG.2C

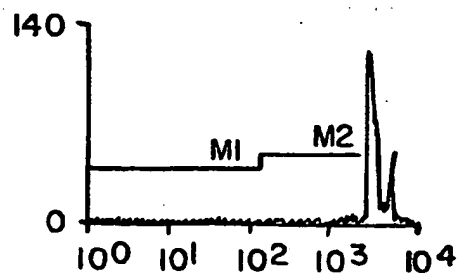


FIG.2D

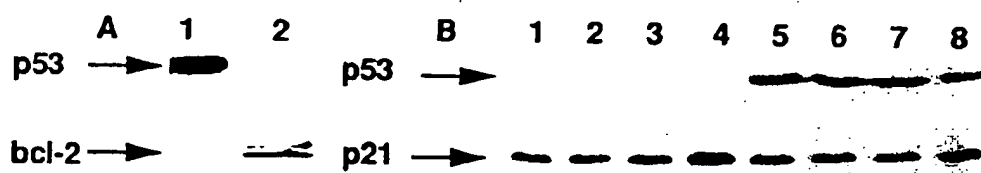


FIG. 3



FIG. 4A

FIG. 4B

FIG. 4C

3/5

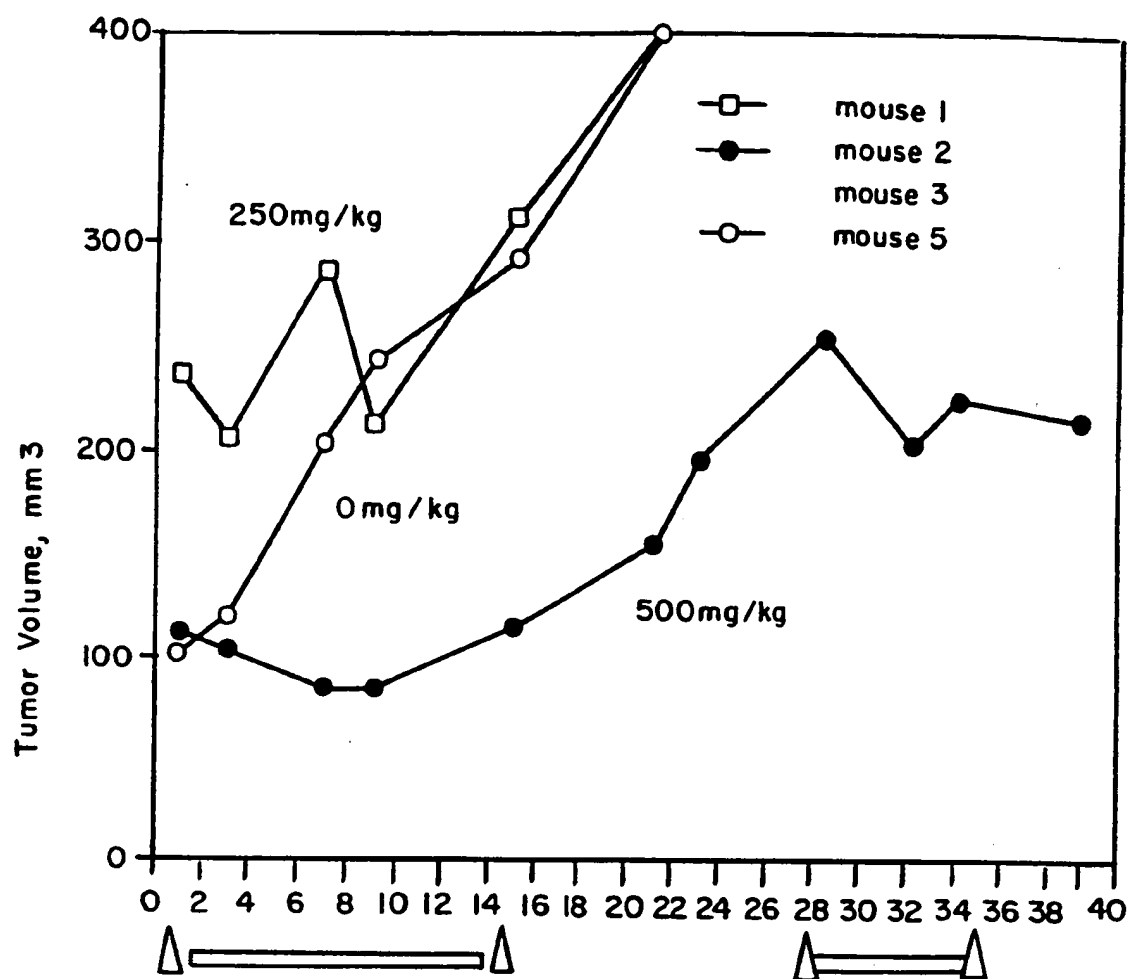


FIG. 5

4 / 5

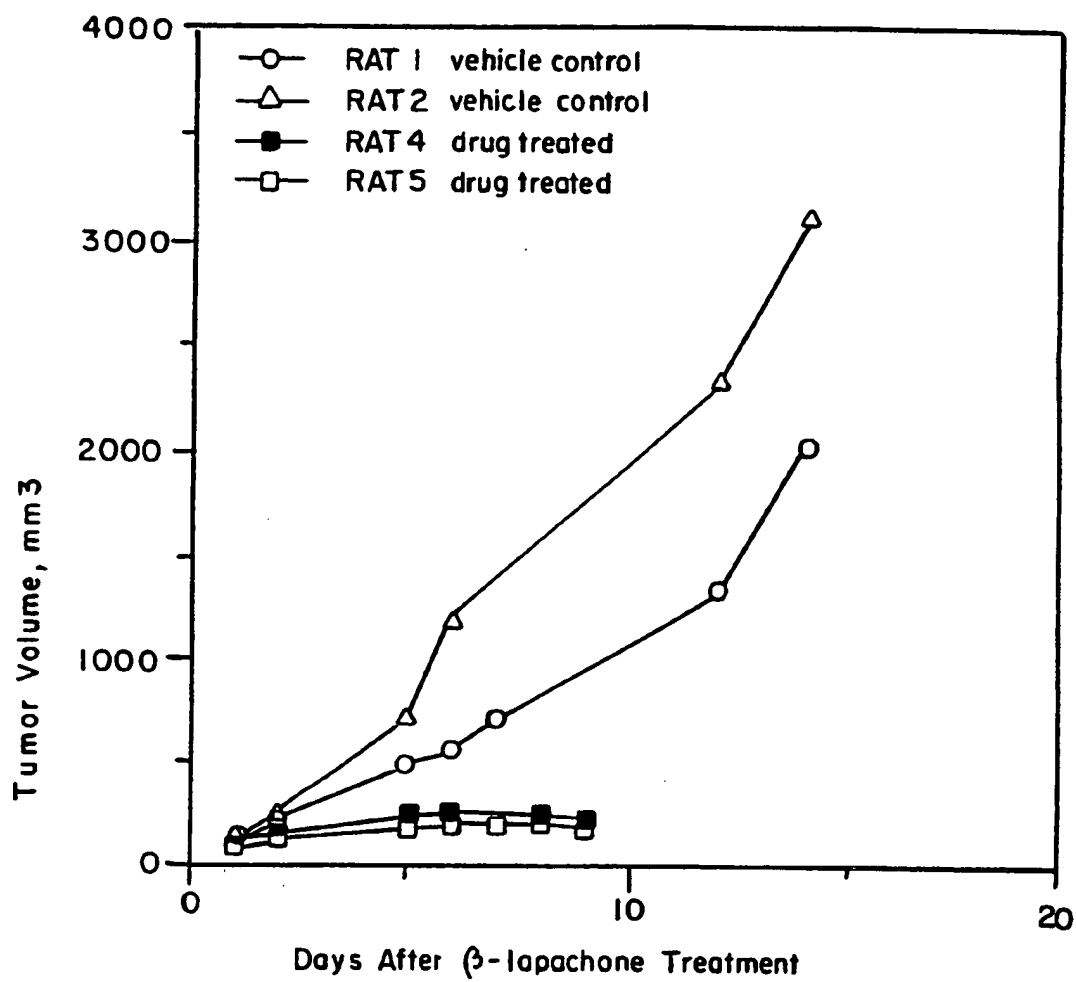


FIG. 6

5 / 5

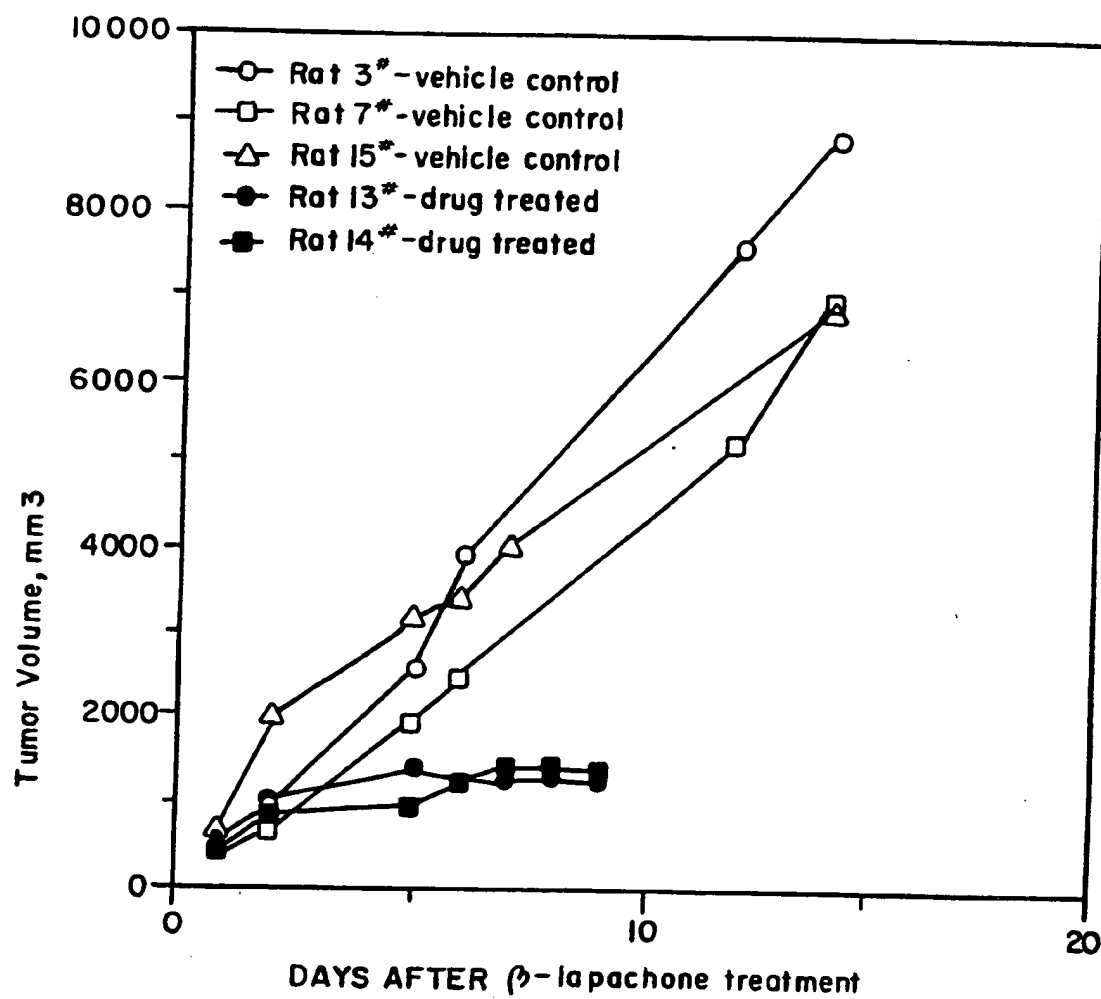


FIG. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC1/US 96/13335

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/35

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	PROC. AM. ASSOC. CANCER RES ANNU. MEET., vol. 37, 1996, pages 429-430, XP000611540 S.M. PLANCHON ET AL.: "Lack of P53 induction in human prostate cancer cells by beta- lapachone, a catalytic inhibitor of topoisomerase I." see the whole document ---	1,2,5
P,X	CANCER RES., vol. 55, no. 17, 1995, pages 3712-3715, XP000611542 C.J. LI ET AL.: "Induction of apoptosis by beta lapachone in human prostate cancer cells." see the whole document ---	1,2,5
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 1996

Date of mailing of the international search report

06.12.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Klaver, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC1/US 96/13335

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>CANCER RES., vol. 55, no. 17, 1995, pages 3706--3711, XP000611541 S.M. PLANCHON ET AL.: "Beta-lapachon-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia(HL-60) and human prostate cancer cells: a P53-dependent response." see the whole document</p>	1,2,5
A	<p>WO,A,94 04145 (DANA FARBER CANCER INSTITUTE) 3 March 1994</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al application No.

PCT/US 96/ 13335

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim(s) 1
is(are) directed to a method of treatment of the human/animal
body, the search has been carried out and based on the alleged
effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such
an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all
searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment
of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report
covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is
restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 96/13335

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member(s)

Publication
date

WO-A-9404145

03-03-94

NONE